

DERWENT-ACC-NO: 1997-551382  
DERWENT-WEEK: 199917  
COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD  
TITLE: Sensor for detecting protein - having receptor  
bound to polymer coating  
through photo-reaction mediated by 3-tri:fluoromethyl-3-(m-  
iso-thi ocyanato  
phenyl)-diazirine  
INVENTOR: SIGRIST, H; WESSA, T  
PATENT-ASSIGNEE: FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH[GESL]  
PRIORITY-DATA: 1996DE-1018812 (May 10, 1996)  
PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES	MAIN-IPC	
DE 19618812 C1	November 20, 1997	N/A
008	G01N 033/68	
WO 9743631 A1	November 20, 1997	G
021	G01N 027/327	
EP 897536 A1	February 24, 1999	G
000	G01N 027/327	

DESIGNATED-STATES: JP US AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE  
IT LU MC NL PT SE AT B  
E CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
DE19618812C1	N/A	1996DE-1018812
May 10, 1996		
WO 9743631A1	N/A	1997WO-EP01501
March 25, 1997		
EP 897536A1	N/A	1997EP-0908292
March 25, 1997		
EP 897536A1	N/A	1997WO-EP01501
March 25, 1997		
EP 897536A1	Based on	WO 9743631
N/A		

INT-CL (IPC): C12Q001/00; G01N027/327 ; G01N033/53 ;  
G01N033/543 ;  
G01N033/68

ABSTRACTED-PUB-NO: DE19618812C

BASIC-ABSTRACT: Sensor for detecting a protein comprises a  
receptor for the  
protein bound to a polymer coating on a sensor body.

Binding between the polymer and receptor is mediated by a  
photoreactive

EP 124676  
~~5986066~~ INT

molecule, namely 3-trifluoromethyl-3-(m-isothiocyanatophenyl)-diazirine (TRIMID), which is covalently bonded to the receptor and inserted into a C-H bond of the polymer.

Also claimed is a process for coating a sensor as above with a protein, where the surface of the sensor is modified, a silane-containing promoter layer is deposited on the surface and a polymer layer is bonded to this, comprising modifying the protein by binding TRIMID to the lysine residues in its amino acid sequence, depositing the modified protein on the polymer layer, partially drying the polymer layer, and covalently binding the modified protein to the polymer layer by UV irradiation.

USE - The sensor is used as a surface acoustic wave (SAW) sensor for detecting proteins such as enzymes, antigens or antibodies.

ADVANTAGE - The sensor is simple to produce and has good reproducibility.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/5

DERWENT-CLASS: A89 B04 D16 J04 S03

CPI-CODES: A12-L04B; B04-N04; B11-C08E; B12-K04A; D05-H09; D05-H10; J04-B01;

EPI-CODES: S03-E14H; S03-E14H4;

PFPN:

19618812

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup>:</b> <b>G01N 27/327, C12Q 1/00, G01N 33/543</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/43631</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. November 1997 (20.11.97)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP97/01501 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 25. März 1997 (25.03.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 18 812.1      10. Mai 1996 (10.05.96)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH [DE/DE]; Weberstrasse 5, D-76133 Karlsruhe (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WESSA, Thomas [DE/DE]; Nonnenbachstrasse 11, D-67346 Speyer (DE). SIGRIST, Hans [CH/CH]; Im Holz 91, CH-3309 Kernenried (CH).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
<b>PTO 2002-1486</b> S.T.I.C. Translations Branch		

**(54) Title: SENSOR FOR DETECTING PROTEINS AND PROCESS FOR ITS PRODUCTION****(54) Bezeichnung: SENSOR ZUM NACHWEIS VON PROTEINEN UND VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG****(57) Abstract**

The invention relates to a sensor for detecting proteins on the key-lock reaction principle, consisting of a sensor body, one surface of which is coated with a polymer layer, where the receptor molecules on the key-lock reaction are bonded to said polymer layer. It is the aim of the invention to design the sensor in such a way that it can be easily and highly reproducibly made. This is achieved in that the bond between the polymer and the receptor molecules is provided by a photoreactive molecule which is covalent to the lysine of a receptor molecule and inserted into a C-H bond of the polyimide.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft einen Sensor zum Nachweis von Proteinen nach dem Prinzip der Schlüssel-Schloß-Reaktion bestehend aus einem Sensorkörper, von dem eine Oberfläche mit einer Polymerschicht überzogen ist, wobei an die Polymerschicht die Rezeptormoleküle der Schlüssel-Schloß-Reaktion gebunden sind. Aufgabe der Erfindung ist es nun, den Sensor so auszugestalten, daß eine einfache Herstellung bei guter Reproduzierbarkeit gegeben ist. Gelöst wird diese Aufgabe dadurch, daß die Bindung zwischen dem Polymer und den Rezeptormolekülen durch ein photoreaktives Molekül vermittelt wird, welches kovalent am Lysin eines Rezeptormoleküls gebunden ist und in eine C-H-Bindung des Polyimids inseriert.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschkistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

- 1 -

**Sensor zum Nachweis von Proteinen und Verfahren zu dessen Herstellung**

Die Erfindung betrifft einen Sensor zum Nachweis von Proteinen nach dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1, wie er aus der DE 44 18 926 bekannt ist und ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Es gibt bislang einige etablierte analytische Verfahren um auch Biomoleküle zu analysieren, die sich aber meist aufwendiger und teurer Labormethoden bedienen (HPLC, GC-MS). Eine ähnlich preisgünstige Alternative zu der hier beschriebenen Methode stellen hingegen die sogenannten Immunoassays dar. Diese basieren ebenfalls auf der Bindung eines Analyten an einen Antikörper, benutzen aber zwangsläufig ein indirektes Verfahren für den Nachweis dieser Bindung. Dabei wird der Probe ein radioaktiv-, fluoreszenz- oder enzymmarkiertes analyt-analoges Molekül zugesetzt, das mit dem Analyt um die Antikörperbindungsstellen konkurriert. Zur Auswertung ist damit ein Verfahren nötig, das aus mehreren Reagenzienzuführungen, Inkubations- und Waschgängen besteht; die Gesamtzeit pro Assay beträgt typischerweise eine Stunde. Eine On-line-Messung ist damit ausgeschlossen.

Darüber hinaus wurden weitere Immunosensorprinzipien in der Literatur beschrieben. Nach Meinung vieler Autoren weichen sie immer noch stark von der Idealvorstellung eines preisgünstigen, genügend empfindlichen zukünftigen Immunosensors ab: In mehreren Übersichtsartikeln wurden solche Methoden bereits aufgrund ihrer hohen Kosten (Oberflächen-Plasmonen-Resonanz, Gitterkoppler, Differentielles Interferometer) bzw. wegen ihrer niedrigen Empfindlichkeit (Potentiometrischer Immunosensor) kritisiert, während der Immunosensor auf Oberflächenwellen (OFW)-Basis bislang favorisiert wurde.

Aus der EP 0 361 729 A2 ist ein Verfahren der e. g. Art zur Erzeugung eines Sensors bekannt, welcher eine Schutzschicht zur räumlichen Trennung von Substrat und wässriger Analytlösung

- 2 -

aufweist. Dieser Sensor weist bei einer Arbeitsfrequenz >100 MHz Dämpfungen zwischen 30 und 40 dB auf, wodurch eine hohe Störanfälligkeit bei starkem Rauschen verursacht wird.

Der Nachteil des in der DE 44 18 926 beschriebenen Sensors besteht darin, daß die Herstellung einen hohen Arbeitsaufwand bei einem hohen Gefährdungspotential erfordert und daß die Sensoreigenschaften eine starke Streuung aufweisen.

Aufgabe der Erfindung ist es nun, einen Sensor der e. g. Art so auszugestalten, daß eine einfache Herstellung bei guter Reproduzierbarkeit gegeben ist.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale der Patentansprüche 1 und 3. Die Unteransprüche beschreiben vorteilhafte Ausgestaltungen des Verfahrens.

Der Sensor ermöglicht die spezifische Messung der Anwesenheit bzw. der Konzentration verschiedener Biomoleküle wie Proteine, Enzyme sowie komplexerer Makromoleküle - Teile des Erbgutes (DNS, RNS) oder verschiedene Krankheitserreger (z. B. Viren oder Bakterien) - durch Direktnachweis der Bindung an spezifische Antikörper in wäßrigen Lösungen. Mit dieser Methode sind damit keine zeitaufwendige Verfahren mehr notwendig, die auf die Konkurrenz zwischen gelabelten und ungelabelten Analyten beruhen (indirektes Nachweisverfahren bei Immunoassays).

Bei dem Sensor handelt es sich um einen massensensitiven Sensor, der die bei der Sorption des Analyten verursachten Schallgeschwindigkeitsänderung von akustischen Oberflächenwellen (OFW) nutzt, um auf die sorbierte Masse des Analyten und somit auf dessen Anwesenheit bzw. Konzentration in der Lösung zurückzuschließen.

Um eine analytenspezifische Sorptionsreaktion zu erhalten, sind selektive Beschichtungen auf dem OFW-Substrat notwendig. Besondere Flexibilität ist hierbei dann gewährleistet, wenn

- 3 -

diese Beschichtungen aus immunochemisch aktiven Molekülen wie Antikörpern oder Antigenen bestehen. Bei dem erfindungsgemäßen Sensor handelt es sich also um einen echten Immunosensor der seine Daten in-situ ermittelt und damit eine echte On-line-Meßmethode für Bioanalytik ermöglicht.

Gegenüber der herkömmlichen Bioanalytik bietet der beschriebene Sensor eine Reihe von Vorteilen:

- Kostengünstig: 4 - 10 DM pro Stück
- Empfindlichkeit wie Bio-Assay
- auf beliebige Biosysteme übertragbar
- sehr gute Langzeitstabilität

Die Erfindung wird im folgenden anhand eines Beispiels mit Hilfe der Figuren näher erläutert.

Fig. 1 zeigt den Verlauf einer enzymatischen Glukosezersetzung auf einem Sensor und die

Fig. 2 zeigt den Verlauf von Immunoreaktionen für unterschiedliche Antikörperkonzentrationen.

Die Fig. 3 zeigt den TRIMID Gehalt des Rezeptorproteins und

die Fig. 4 dessen Enzymaktivität anhand von Absorptionsspektren.

Die Fig. 5 zeigt die Rezeptoranbindung an das Polymer Polyimid.

Der Sensor in unserem Beispiel arbeitet auf der Basis akustischer Oberflächenwellen. Ein solcher Sensor wird in der DE 43 19 215 beschrieben.

Der Sensorkörper wird auf einer Seite zunächst mit einem Polymer, in diesem Beispiel einem aromatischen Polyimid beschichtet. Die Beschichtung der Oberfläche des Sensorkörpers mit Polyimid erfolgt wie in der DE 44 18 926, S. 3, Zeilen 11 bis 55 beschrieben. Auf die polyimidierte Sensoroberfläche werden anschließend 10  $\mu$ l des geeignet verdünnten, modifizierten Rezeptormoleküls gegeben.

Wie in Fig. 5 zu erkennen ist, kommt es nur zur Immobilisation von photomarkierten Enzym auf der polyimidierten Sensoroberfläche, wenn der Wassergehalt in der Proteinmatrix niedrig gehalten wird. Bei einem zu hohen Wassergehalt im Protein kommt es bei Belichtung zur Reaktion des Carbens mit Wasser, so daß die Insertierungsreaktion zwischen Polyimid und Protein in den Hintergrund gedrängt wird und die Anbindung an die Sensoroberfläche ausbleibt. Aus diesem Grund werden die Sensoren 20-40 min in einem Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur und einem Druck < 10 mbar behandelt. Optimal ist eine 30 minütige Trocknung bei 1 mbar. Der daraus resultierende eingetrocknete Enzymfilm wurde anschließend mit einer Quecksilberdampflampe belichtet. Zur Erzeugung der Tripletcarbene ist eine Belichtung des Enzymfilms bei 348 nm und 0,7 mW/cm<sup>2</sup> für 30 min notwendig.

Zur Immobilisierung wurde mit TRIMID modifizierte Glucoseoxidase (T-Glucoseoxidase, T-GOD) mit einem Proteingehalt von 1.92 mg/ml verwendet. Der TRIMID-Gehalt betrug 6.5 mol TRIMID pro mol Glucoseoxidase.

Voruntersuchungen zeigten, daß die T-GOD-Lösung nicht unverdünnt auf dem Sensor abgeschieden werden konnte. Bei einer zu hohen Proteinkonzentration kommt es zu hohen Eingangsdämpfungen und es kann keine akustische Welle beobachtet werden.

Als Ergebnis dieser Voruntersuchungen wurde die T-Glucoseoxidaselösung im Verhältnis 1:125 mit Phosphatpuffer (1 : 100) verdünnt, 10  $\mu$ l dieser Lösung auf den Sensor gebracht und das



- 5 -

Enzym, wie oben beschrieben, immobilisiert (vakuumbehandelt, belichtet).

Mittels eines enzymatischen Assays konnte die auf der Sensoroberfläche abgeschiedene Menge an Enzym spektroskopisch bestimmt werden.

Zur Durchführung der Enzymaktivitätsüberprüfung sind folgende Lösungen notwendig:

#### Lösung 1

53 mg 3,5-Dichlor-2-Hydroxy-Benzosulphonsäure werden in Wasser (bidest.) gelöst und mit 1 M NaOH auf pH=7 gebracht. Dann werden 3 mg Peroxidase (Meerrettich) zugegeben und auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt.

#### Lösung 2

16.2 mg 4-Aminophenazon werden in 10 ml Wasser gelöst.

#### Lösung 3

1.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  und 700 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  sowie 37.2 mg EDTA werden in 100 ml Wasser gelöst.

#### Lösung 4

1.8 g -D-Glucose werden in 10 ml Wasser gelöst.

In eine Küvette werden dann

1.55 ml von Lösung 3

0.2 ml von Lösung 4

0.2 ml von Lösung 1

50  $\mu\text{l}$  von Lösung 2

gegeben und nach guter Durchmischung (Vortex) der Hintergrund bei 520 nm vermessen. Anschließend gibt man 50  $\mu\text{l}$  einer angemessen verdünnten GOD-Lösung hinzu und mißt die Absorptionsänderung bei 520 nm (Ausbildung eines roten Farbstoffs) innerhalb der ersten Minuten. Bei hohen Glucoseoxidasekonzentratio-

- 6 -

nen genügen 2 Minuten, bei den auf dem Sensor abgeschiedenen Mengen an Antigen wurde 10-20 Minuten lang gemessen.

Der Extinktionskoeffizient des entstehenden Farbstoffs beträgt  $13300 \text{ (M cm)}^{-1}$ . Damit ist es möglich die spezifische Enzymaktivität der Glucoseoxidaselösung zu bestimmen. Diese wird in "units/mg" angegeben, wobei eine "unit" wie folgt definiert ist: Eine "unit" oxidiert  $1 \mu\text{mol}$  -D-Glucose pro Minute bei  $\text{pH}=5.1$  ( $T=35^\circ\text{C}$ ).

Da zur Erzeugung von 1 mol des roten Farbstoffs 2 mol Wasserstoffperoxid (aus der Glucosespaltung) notwendig sind, entspricht die gemessene Zunahme des Chromophors 0.5 units pro Minute.

Die Zunahme der Absorption bei 520 nm ist exemplarisch für drei verschiedene Sensoren in Fig. 1 angegeben. Daraus ergibt sich ein Mittelwert der Steigungen von 0.0021 Absorptionseinheiten pro Minute. Ein Vergleich mit der Enzymaktivität der T-GOD-Stammlösung zeigt, daß diese Absorptionszunahme einer Proteinmasse auf dem gesamten Sensor von 18.5 ng entspricht.

Die Bestimmung der Sensorempfindlichkeit sowie der Nachweisgrenze für polyklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase erfolgte durch Variation der Antikörpermenge im Analytstrom.

Dazu wurden die Sensoren mit T-Glucoseoxidase über die beschriebene photoinitierte Reaktion beschichtet und zunächst mit Rinderserumalbumin (4 mg/ml) gespült, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Da die Sensoren im Durchfluß mit dem Protein beprobt wurden, zeigten sie unterschiedliche Abscheidungsgeschwindigkeiten, die dann aber alle zu einer (innerhalb eines Fehlerbereichs von 10 %) Frequenzänderung von 35 kHz gelangten.

Die so vorbehandelten Sensoren wurden dann einzeln mit Antikörperlösung beprobt, wobei der Analyt - polyklonale Antikörper-

- 7 -

per gegen Glucoseoxidase - im Kreislauf über die Sensoren geleitet wurde. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Antikörpermengen in 5 ml Phosphatpuffer gelöst und über die Sensoren geleitet. Die Konzentrationsreihe, die in Auszügen in Fig. 2 dargestellt ist, beinhaltete einen Bereich von 2 - 200  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper (entspricht 10-1000  $\mu\text{g}$ ).

Es sind verschiedene Frequenzabnahmen sowie unterschiedliche Anfangsgeschwindigkeiten der Immunoreaktionen zu erkennen.

Die Änderung der Resonanzfrequenz des Oszillators wurde gegen die Antikörpermenge im Analytstrom aufgetragen. Die Steigung der Gerade gibt die Sensorempfindlichkeit wieder, die zu 58.8 Hz/ $\mu\text{g}$  bestimmt wurde.

Um die Korrelation zwischen Antikörpermenge und Reaktionsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde für jede Messung die Anfangsgeschwindigkeit der Immunoreaktion ermittelt. Aus den Meßpunkten innerhalb der ersten Minute nach Analytzugabe konnte durch lineare Regression die Frequenzabnahme pro Zeiteinheit berechnet werden. Die Korrelationskoeffizienten waren bei allen ausgewerteten Kurven deutlich größer als 0.98.

Die so ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten korrelieren mit der zugegebenen Antikörpermenge. Es resultiert ein deutlich linearen Zusammenhang zwischen den beiden Größen ( $r = 0.9822$ ). Die Steigung der Regressionsgerade beträgt 4.92 Hz/(s $\mu\text{g}$ ).

Um die Nachweisgrenze für polyklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase zu bestimmen, geht man wie folgt vor.

Die Empfindlichkeit beträgt 58.8 Hz/ $\mu\text{g}$ , der Achsenabschnitt wurde mit 27.1 kHz bestimmt. Mit diesen Werten kann unter Einbezug des dreifachen Rauschsignals der Sensoren (120 Hz), die Nachweisgrenze für polyklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase zu 2  $\mu\text{g}$  bzw. 13.6 pmol bestimmt. Da die jeweilige Antikörpermenge in 5 ml Phosphatpuffer eingewogen wurde, entspricht die-

- 8 -

ser Wert einer minimal detektierbaren Konzentration von 2.7 nmol/l.

Das beschriebene Beschichtungsverfahren kann auch auf andere Sensor- bzw. Meßprinzipien übertragen werden. Beispielsweise können die Sensorchips des Optischen Gitterkopplers in gleicher Weise mit modifizierten Rezeptormolekülen beschichtet werden.

Als mögliche Rezeptormoleküle können Enzyme, Antigene und Antikörper sowie Nukleinsäuren verwendet werden.

Ein Beispiel für eine Beschichtung ist an dem Antigen Glucoseoxidase gezeigt, das direkt mit 3-Trifluoromethyl-3-(m-isothiocyanophenyl)-diazirin (TRIMID) umgesetzt wurde, um so zu einem photoreaktiven Protein zu gelangen. Den Antikörper selbst mit TRIMID zu modifizieren ist prinzipiell ebenso möglich, aber kostenintensiver.

Der Syntheseweg konnte nicht direkt von dem literaturbekannten T-BSA auf T-GOD übertragen werden, da Glucoseoxidase das Coenzym FAD enthält, das nicht kovalent an das Enzym gebunden ist. Durch die Umsetzung von GOD mit TRIMID bei pH 11.4 mittels Inkubation bei 50°C wurde Glucoseoxidase zwar mit TRIMID modifiziert, das Coenzym aber war abgetrennt, was durch das UV-Spektrum nachgewiesen wurde. Es konnte eine Schulter bei 348 nm (TRIMID) festgestellt werden, die FAD-Peaks bei 375 bzw. 450 nm waren nicht mehr zu erkennen.

Untersuchungen haben gezeigt, daß die Inkubation bei 50°C zur Abtrennung des Coenzyms führt, die Behandlung des Enzyms bei pH=11.4 diese Dissoziation jedoch nicht herbeiführt.

T-GOD wurde deshalb nach folgender Vorschrift hergestellt:

18 mg Glucoseoxidase und 1.27 g -D-Glucose wurden in 0.1 Vol-%

- 9 -

TEA (in Wasser, pH = 11.4) gelöst und die resultierende Lösung mit reinem TEA auf einen pH von 10.4 eingestellt.

Zugabe von 170  $\mu$ l TRIMID (29  $\mu$ mol/l) in Chloroform  
30 sec im Ultraschallbad beschallen, wobei eine milchig gelbe Suspension entstand

2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubieren

über eine Sephadex G-25-Säule in 1.5 mM NaCl, 0.05 mM Natriumphosphatpuffer (pH=7.4) chromatographieren .

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration ist mit der Methode nach Lowry möglich. Dazu wurde ein speziell vorbereiteter BSA-Standard als Referenz vermessen und die Extinktionen des T-GOD darauf bezogen.

Für diese Untersuchung war eine Stammlösung aus 0.5 ml 2%-iger  $\text{CuSO}_4$ -Lösung, 0.5 ml 2%-iger Tartratlösung und 49 ml 2%-iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung in 0.1 M NaOH notwendig. Um die Proteinkonzentration der Fraktionen 12 und 13 zu bestimmen, wurden 100  $\mu$ l mit PBS (1:100) auf 1 ml verdünnt und 6 Proben hergestellt, indem jeweils 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l und 30  $\mu$ l auf 200  $\mu$ l mit PBS (1:100) verdünnt wurden (Doppelbestimmung). Zu diesen Proben kam je 1 ml der Stammlösung hinzu, das Gemisch wurde 10 min stehen gelassen.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l 0.5 N Folinlösung, die ein Extinktionsmaximum bei 578 nm erzeugt, was nach 30 min vermessen werden konnte. Mit Hilfe des BSA-Standards konnte anschließend die Proteinmenge von T-GOD errechnet werden; es ergab sich eine Proteinmassenkonzentration von 4.22 mg/ml.

Der Trimidgehalt eines Proteins kann durch den Extinktionsunterschied einer Probe vor und nach dem Belichten bei 348 nm überprüft werden. Bei Glucoseoxidase stellt sich das Problem, daß die FAD-Moleküle in diesem Bereich ebenfalls Licht absor-

- 10 -

bieren, was den TRIMID-Peak überdeckt. Bei der Bestimmung des TRIMID-Anteils in T-GOD wurde die Tatsache ausgenutzt, daß das FAD nach einer Inkubation bei erhöhter Temperatur vom Enzym abgetrennt wird. Da der FAD-Peak die Absorptionsbande von TRIMID überlagert, wurde zur Detektion von TRIMID zunächst das FAD abgetrennt, indem das Protein (jeweils 500 µl) 2 h bei 50° C inkubiert und anschließend die Lösung über eine PD10-Säule chromatographiert wurde. In der Enzymfraktion war danach nur noch der Proteinpeak bei 280 nm erkennbar.

Die Proteinfraction wurde dann in der Küvette 2 mal je 10 min belichtet und nach jeder Belichtung ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Man erkennt in Fig. 3 deutlich eine Veränderung der Absorption zwischen 340 nm und 400 nm, also im Bereich der TRIMID-Bande.

Der Gehalt an kovalent gebundenem TRIMID betrug  $8 \pm 2$  mol TRIMID pro mol Glucoseoxidase.

Die enzymatische Aktivität des modifizierten Proteins konnte spektroskopisch mittels des oben beschriebenen enzymatischen Assays ermittelt werden. Dazu wurden 50 µl T-GOD, die 8.73 µg Protein enthielten untersucht.

Mit dieser Methode wurde die enzymatische Aktivität der verwendeten Glucoseoxidaselösungen bestimmt. In Fig. 4 ist die Kinetik der enzymatischen Katalyse der Stammlösung (GOD) sowie die des modifizierten Enzyms (T-GOD) dargestellt.

Durch den linearen Teil der Kurve wurde mittels linearer Regression jeweils eine Gerade bestimmt. Diese diente als Kalibriergerade zur Detektion der enzymatischen Aktivität der jeweiligen Glucoseoxidase auf dem Sensor.

Die Bestimmung der Absorptionzunahme mittels linearer Regression ergab für T-GOD einen Wert von  $0.989 \text{ min}^{-1}$ . Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann daraus die spezifische En-

- 11 -

zymaktivität der modifizierten Glucoseoxidase mit 34.92 units/mg bestimmt werden. Im Vergleich dazu besitzt die nicht modifizierte Glucoseoxidase einen Wert von 87.59 units/mg.

Um die Anbindung von T-GOD auf einer Oberfläche und im speziellen an Polyimid zu beobachten, wurde das erzeugte T-GOD mit [ $^{14}\text{C}$ ] markiert. Dazu wurde die Glucoseoxidase zunächst reduktiv methyliert und anschließend auf einer polyimidisierten Oberfläche immobilisiert.

Bei der reduktiven Methylierung werden Aminofunktionen mit Formaldehyd umgesetzt und die entstehenden Schiff'schen Basen reduziert. Diese hochspezifische Reaktion greift nur die -Aminogruppen der Lysineinheiten im Protein sowie den N-Terminus in der Aminosäuresequenz an. Um eine Denaturierung durch Zerstörung der Disulfidbrücken sowie die sofortige Reduktion des Formaldehyds zu vermeiden, wird als mildes Reduktionsmittel Natriumcyanborhydrid verwendet, was zu N,N-Dimethylderivaten führt. Es resultiert eine nahezu vollständige Umsetzung bei Einsatz des sechsfachen Überschusses an Formaldehyd, bezogen auf die Proteinmasse.

Da die reduktive Methylierung in HEPES-Puffer (pH=7.5) abläuft, wurde 1 ml T-GOD (4.22 mg/ml) über einer PD10-Säule umpuffert und die Proteinfraction zur radioaktiven Markierung verwendet. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

800  $\mu\text{l}$  dieser Proteinfraction wurden in ein lichtgeschütztes Reaktionsgefäß gebracht (Schutz der TRIMID-Gruppe)  
Zugabe von 6.5  $\mu\text{l}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Formaldehyd (=200 nmol), mit einer Radioaktivität von 11.6  $\mu\text{Ci}$

Zugabe von 100  $\mu\text{l}$   $\text{NaCNBH}_3$  (=240 mmol/l)  
auffüllen mit HEPES-Puffer auf 1 ml

3 h rühren bei Raumtemperatur

das Produkt wurde über einer PD10-Säule chromatographiert, um überschüssiges Formaldehyd abzutrennen.

- 12 -

Die T-GOD-Fraktion des radioaktiv markierten Enzyms wurde wie oben beschrieben auf den Proteingehalt untersucht. Es ergab sich eine Proteinkonzentration von 0.915 mg/ml.

Um den Grad der radioaktiven Modifizierung von T-GOD zu bestimmen, wurden jeweils 5  $\mu$ l der einzelnen Fraktionen der [ $^{14}$ C]-T-GOD-Synthese mit 5 ml Szintillationslösung (eine Mischung aus 1080 ml Toluol p.a., 5.4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 0.2 g 2,2'-p-Phenyl-bis-5-Phenyloxazol (POPOP), 920 ml Triton und 40 ml Eisessig) vermischt (Vortex) und die -Strahlung mit einem Szintillationszähler bestimmt.

In der Proteinfraktion wurde eine Aktivität von 2793 dpm (dpm=decompositions per minute) gefunden. Die Korrelation dieser Werte mit den Ergebnissen der Proteinbestimmung nach Lowry des radioaktiv markierten Proteins ergab 597 dpm/ $\mu$ g Protein.

Die enzymatische Aktivität der radioaktiv markierten Proteinfraktion wurde wiederum mittels des enzymatischen Assays bestimmt. Dazu wurden 20  $\mu$ l der Proteinfraktion mit HEPES auf 200  $\mu$ l verdünnt und von 50  $\mu$ l dieser Lösung (= 4.6  $\mu$ g) die enzymatische Aktivität bestimmt.

Die Auswertung ergab eine Absorptionszunahme von 0.27  $\text{min}^{-1}$ , was einer spezifischen Enzymaktivität von 18.19 units/mg entspricht. Das bedeutet, daß selbst nach zwei Modifikationen des Proteins die enzymatische Aktivität noch vorhanden ist.

Um die Ankopplung des Proteins an eine polyimidisierte Oberfläche zu beobachten, wurden Deckplättchen aus Glas polyimidiert, anschließend mit [ $^{14}$ C]-T-GOD beschichtet und die Radioaktivität gemessen. Die Polyimidisierung von hydrophilen Oberflächen ist neben anderen Methoden eine wichtige Grundlage für Immobilisationen auf akustoelektrischen Bauelementen.

Auf die polyimidisierten Glasplättchen wurden 30-50  $\mu$ l des radioaktiv markierten Enzyms aufgebracht, nach einer definierten



- 13 -

Einwirkzeit belichtet und anschließend gewaschen. Als Kontrollexperiment wurden analog behandelte, jedoch unbelichtete Plättchen mitgeführt.

Die Waschprozedur bestand aus fünfmaligem Spülen der Plättchen mit einer Lösung aus 50 mM PBS, 150 mM NaCl sowie 0.02 Vol-% TWEEN 20. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Abdeckplättchen in die Szintillationsröhren gebracht, mit 5 ml Szintillationslösung bedeckt und nach kurzem Mischen (Vortex) die -Strahlung der polyimidisierten Glasträger bestimmt. In Fig. 5 ist zu erkennen, daß die Belichtung nach 30 min Einwirken keine Anbindung an das Polyimid bewirkt. Die Strahlung dieser Glasplättchen liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie die der unbelichteten Kontrollproben. Erst nach wesentlich längeren Einwirkzeiten vor der Belichtung bzw. partielle Trocknung durch Anlegen eines Vakuums, was einen völlig eingetrockneten Proteinfilm zur Folge hatte, kommt es zur kovalenten Anbindung des Proteins an das Polyimid, was durch die deutlich höhere Radioaktivität der entsprechenden Glasträger zu erkennen ist.

Eine Photoimmobilisation von T-GOD auf Polyimid ist folglich möglich, sofern nur wenig Wasser in der Proteinmatrix vorhanden ist. Bei Anwesenheit von Wasser ist der Modifizierungsgrad von T-GOD mit TRIMID zu gering, so daß alle durch Belichtung erzeugten Carbene mit Wasser abreagieren und es zu keiner meßbaren Anbindung an die Oberfläche kommt. Weiterhin zeigen diese Untersuchungen, daß die gewählte Waschprozedur geeignet ist, unspezifisch anhaftende Proteinmoleküle von der polyimidisierten Oberfläche zu entfernen sowie Restradioaktivität auszuwaschen.

Patentansprüche:

1. Sensor zum Nachweis von Proteinen nach dem Prinzip der Schlüssel-Schloß Reaktion bestehend aus einem Sensorkörper, von dem eine Oberfläche mit einer Polymerschicht überzogen ist, wobei an die Polymerschicht die Rezeptormoleküle der Schlüssel-Schloß Reaktion gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung zwischen dem Polymer und den Rezeptormolekülen durch ein photoreaktives Molekül vermittelt wird, welches kovalent am Rezeptormolekül gebunden ist und in eine C-H-Bindung des Polymers insertiert.
2. Sensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das photoreaktive Molekül 3-Trifluoromethyl-3-(m-isothiocyanatphenyl)-diazirin (TRIMID) ist.
3. Verfahren zum Beschichten von Sensoren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, mit Proteinen, wobei die Oberfläche des Sensors modifiziert wird und wobei auf der Sensoroberfläche eine silanhaltige Promoterschicht aufgebracht und daran eine Polymerschicht angebunden wird, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
  - a) modifizieren der Proteine durch Anbinden von carbenerzeugenden Molekülen an die Lysineinheiten der Aminosäuresequenzen der Proteine,
  - b) aufbringen der modifizierten Proteine auf die Polymerschicht
  - c) partielle Trocknung dieser Schicht und
  - d) kovalente Anbindung der modifizierten Proteine an die Polymerschicht durch Einwirkung von UV-Licht.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die carbenerzeugenden Moleküle TRIMID sind.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Trocknungsgrad der Schicht durch anlegen von Vakuum erreicht wird.

Fig. 1

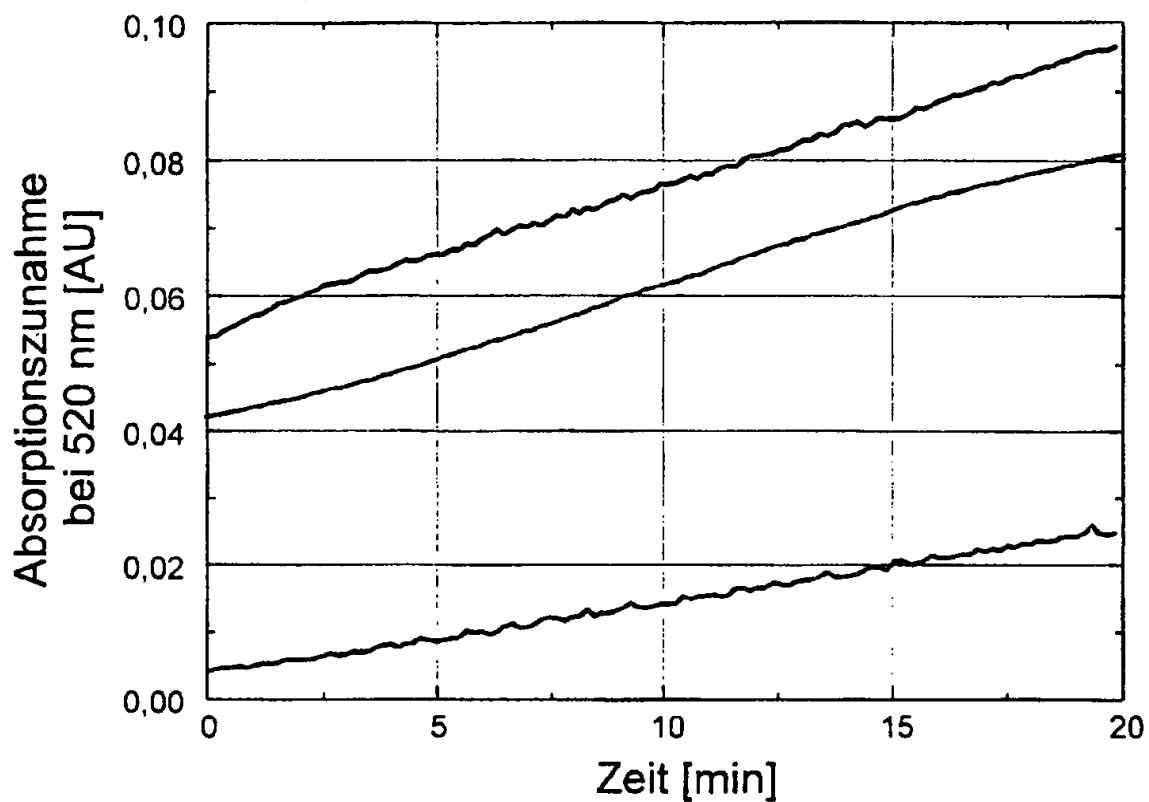


Fig. 2

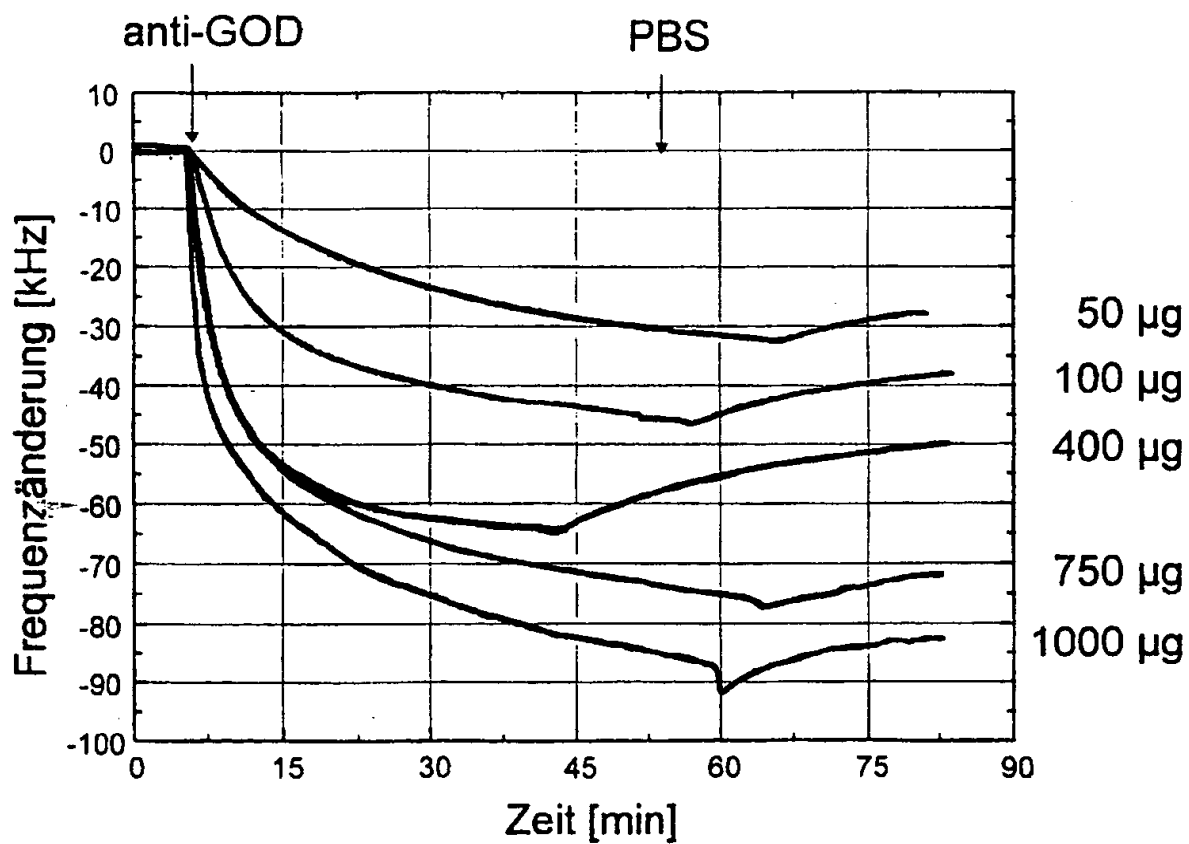


Fig. 3

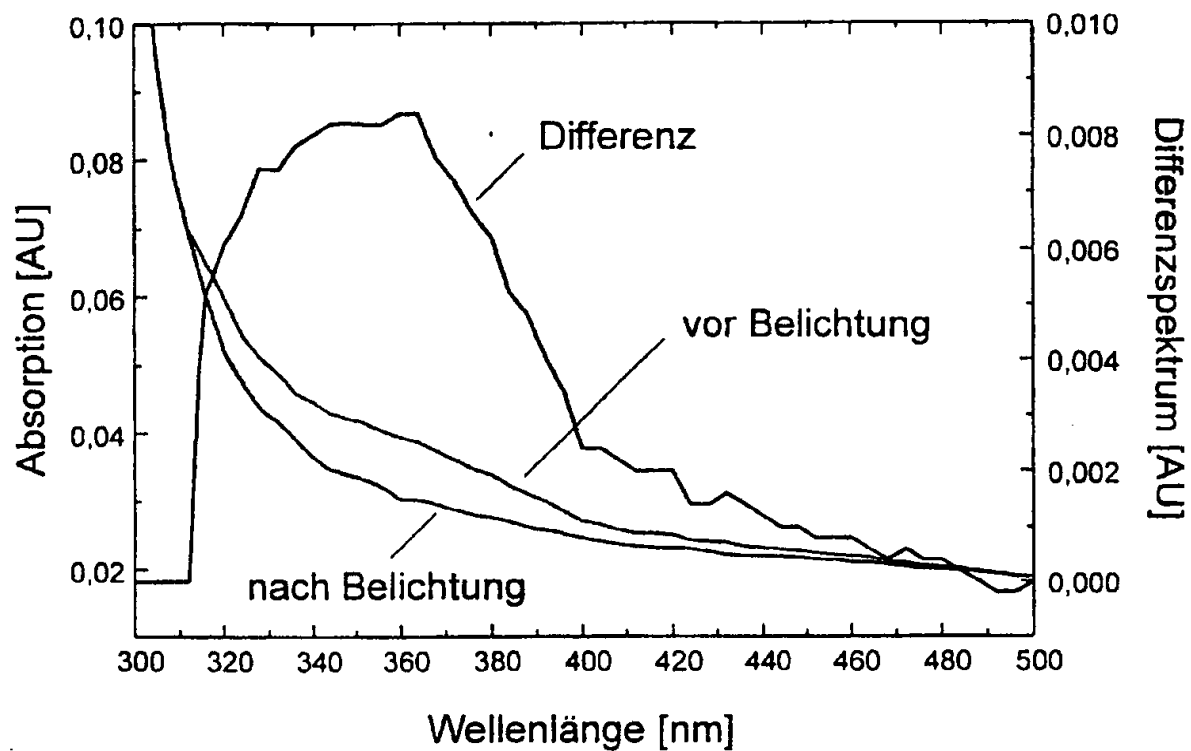


Fig. 4

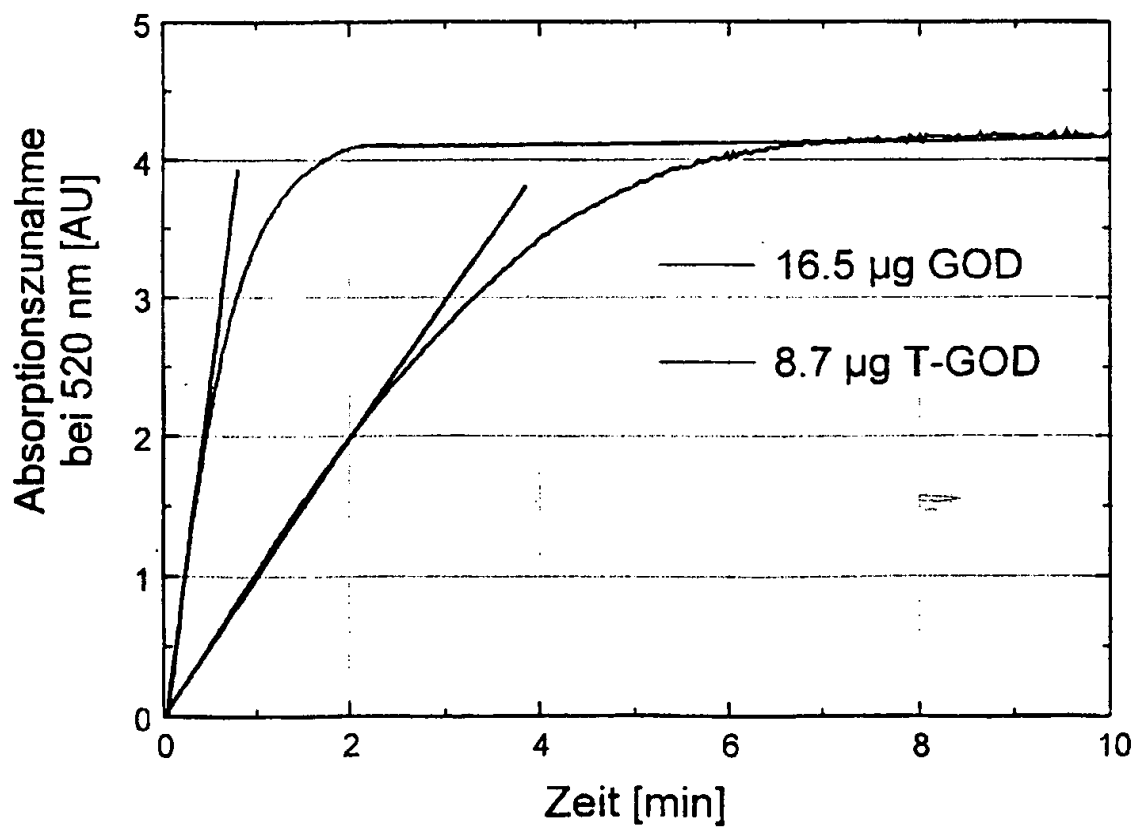
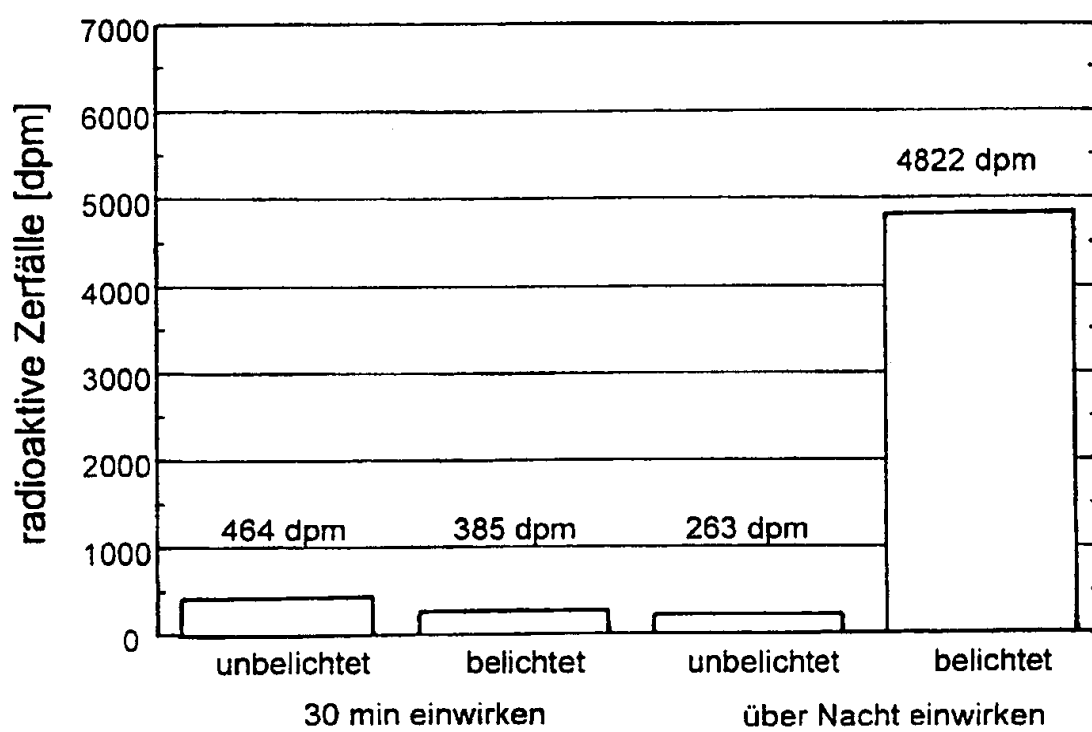


Fig. 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 97/01501

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 G01N27/327 C12Q1/00 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 16425 A (SIGRIST HANS ;KLINGLER DABRAL VIBHUTI (DE); DOLDER MAX (CH); WEGMU) 31 October 1991 see the whole document ---	1-3
A	EP 0 578 148 A (HOFFMANN LA ROCHE) 12 January 1994 see the whole document ---	1
A	DE 44 18 926 C (KARLSRUHE FORSCHZENT) 8 February 1996 cited in the application see the whole document -----	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <span style="margin-left: 100px;"><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span>		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">16 June 1997</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">24-06-1997</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Moreno, C</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/01501

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9116425 A	31-10-91	EP 0484472 A	13-05-92
EP 0578148 A	12-01-94	CA 2098960 A	11-01-94
		JP 6174722 A	24-06-94
DE 4418926 C	08-02-96	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCI/EP 97/01501

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 G01N27/327 C12Q1/00 G01N33/543

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 91 16425 A (SIGRIST HANS ;KLINGLER DABRAL VIBHUTI (DE); DOLDER MAX (CH); WEGMU) 31.Oktober 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-3
A	EP 0 578 148 A (HOFFMANN LA ROCHE) 12.Januar 1994 siehe das ganze Dokument ---	1
A	DE 44 18 926 C (KARLSRUHE FORSCHZENT) 8.Februar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*A\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16.Juni 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24-06-1997

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PLI/EP 97/01501

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9116425 A	31-10-91	EP 0484472 A	13-05-92
EP 0578148 A	12-01-94	CA 2098960 A	11-01-94
		JP 6174722 A	24-06-94
DE 4418926 C	08-02-96	KEINE	